

Untersuchung des Resistenzfaktors RP4 in *Rhizobium meliloti*

von

Marlanne Spitzbarth

aus

Kulmbach

1976 # 225



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546228_0084



Untersuchung des Resistenzfaktors RP4 in *Rhizobium meliloti*

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Marianne Spitzbarth

aus

Kulmbach

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

4. Febr. 1976

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. H. Remmert

Erstberichterstatte

Professor Dr. W. Heumann

Zweitberichterstatte

Professor Dr. E. Schweizer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	3
III. Material und Methoden	5
III.1. Bakterienstämme, Nährmedien und Puffer	5
III.2. Chemikalien und Verzeichnis der Abkürzungen	8
III.3. Methoden zum genetischen Teil	11
III.4. Methoden zum molekularbiologischen Teil	14
III.5. Methoden zum Nachweis der symbiontischen Stickstofffixierung	17
III.6. Isolierung lebensfähiger Bakterien aus Knöllchen	19
IV. Ergebnisse	20
IV.1. Genetische Experimente mit dem RP ⁴ -Faktor in <u>R.meliloti</u>	20
IV.1.1. Transfer des RP ⁴ -Faktors nach <u>R.meliloti</u>	20
IV.1.2. Nachweis der genetischen Eigenschaften des RP ⁴ -Faktors in <u>R.meliloti</u>	22
a) Nachweis der RTF-Einheit des RP ⁴ - Faktors in <u>R.meliloti</u>	23
b) Nachweis der Resistenzgene des RP ⁴ - Faktors in <u>R.meliloti</u>	24
c) Test auf PRR1-Sensitivität bei <u>R.meliloti</u>	25

	Seite
IV.1.3. Stabilität des RP4-Faktors in <u>R.meliloti</u>	26
a) Stabilität des RP4-Faktors in Ab- hängigkeit von der Wuchsphase	26
b) Einfluß einer Knöllchenpassage auf den RP4-Faktor in <u>R.meliloti</u>	27
IV.2. Molekularbiologischer Nachweis des RP4- Faktors in <u>R.meliloti</u>	29
IV.2.1. CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation	29
IV.2.2. Isolierung von RP4-DNA aus <u>R.meliloti</u>	30
IV.2.3. Identifikation der isolierten Plasmid- DNA durch elektronenmikroskopische Dar- stellung und anschließende Längen- messung	30
IV.3. Einfluß des RP4-Faktors auf Infektivität und Effektivität von <u>R.meliloti</u>	33
IV.4. Mischinfektionsexperiment mit zwei ver- schieden markierten <u>R.meliloti</u> -Stämmen	40
V. Diskussion	42
V.1. Genetische Untersuchungen am RP4-Faktor in <u>R.meliloti</u>	42
V.2. Molekularbiologische Untersuchungen am RP4- Faktor in <u>R.meliloti</u>	46
V.3. Einfluß des RP4-Faktors auf die Effektivität von <u>R.meliloti</u>	46
V.4. Mischinfektionsexperiment	48
VI. Literaturverzeichnis	51

I. Zusammenfassung

Der in Pseudomonas aeruginosa entdeckte Resistenzfaktor RP4 wurde mit einer Übertragungshäufigkeit von 20% von Rhizobium lupini auf den zur symbiontischen Stickstofffixierung befähigten Bakterienstamm Rhizobium meliloti übertragen. Ein RP4-Transfer von Escherichia coli nach Rhizobium meliloti war wesentlich seltener. Alle bekannten genetischen Eigenschaften des RP4-Faktors konnten in Rhizobium meliloti nachgewiesen werden:

- (1) Der Erwerb der Antibiotikaresistenzgene wurde durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gezeigt.
- (2) Die Resistenztransfer-Einheit (RTF-Einheit) wurde durch Transfer des RP4-Faktors auf andere Bakterienstämme nachgewiesen.
- (3) Lediglich die Sensitivität gegen den bei Escherichia coli (RP4) bekannten RNA-Phagen PRR1 wird von Rhizobium meliloti (RP4) nicht ausgedrückt.

Eine hohe Verträglichkeit des RP4-Faktors mit der Wirtszelle kommt in seiner außerordentlichen Stabilität in Rhizobium meliloti zum Ausdruck. Spontanverlust genetischer Markierungen wurden nicht beobachtet. Der RP4-Faktor wurde aus Rhizobium meliloti durch Lyse und Cäsiumchlorid-Äthidumbromid-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und im Elektronenmikroskop dargestellt (Länge $19.41 \pm 0.62 \mu\text{m}$). RP4-Faktoren aus Bakterien, die aus Wurzelknöllchen von Luzerne (*Medicago sativa*) zurückgewonnen wurden, wiesen die gleiche Länge auf. Der RP4-Faktor stellte im einzigen verfügbaren ineffektiven Rhizobium meliloti

Stamm die Fähigkeit zur symbiontischen Stickstofffixierung wieder her. Er übersteht unverändert in Rhizobium meliloti eine Knöllchenpassage bei Luzerne. Die aus Wurzelknöllchen reisolierten lebensfähigen Bakterien enthalten alle den vollständigen RP4-Faktor. Mischinfektion einer Luzernepflanze wurde mit einem RP4-freien und einem RP4-tragenden Rhizobium meliloti-Stamm durchgeführt. Der RP4-freie Stamm dominiert bei der Infektion, Mischinfektion ist möglich. In den gemischt infizierten Wurzelknöllchen wurde RP4-Transfer, nicht aber chromosomaler Transfer beobachtet.

II. Einleitung

Als biologische Stickstofffixierung wird die Fähigkeit bestimmter Mikroorganismen bezeichnet, molekularen Luftstickstoff zu Ammoniumverbindungen zu reduzieren. Die Bodenbakterien der Gattung Rhizobium binden Luftstickstoff symbiontisch mit Leguminosen. Die in dieser Arbeit untersuchte Spezies Rhizobium meliloti führt diese Stickstoffreduktion in Verbindung mit Melilotus alba (Steinklee) und Medicago sativa (Luzerne) durch. Dazu infizieren sie die Wurzelhaare der Pflanze, durchwachsen das Rindengewebe eingeschlossen in einen Infektionsschlauch, induzieren die Bildung von Wurzelknöllchen und werden in diesen Knöllchen zu Bakteroiden umgewandelt. In diesen Bakteroiden, die außerhalb der Pflanze nicht mehr lebensfähig sind, läuft die symbiontische Stickstofffixierung ab. Es wird vermutet, daß die genetische Information für die die Reaktion katalysierenden Enzyme extrachromosomal als Plasmid vorliegt (1). Nachweis und Isolierung solcher Plasmide würden es erlauben, die genetische Information für die Stickstofffixierung eingehender zu untersuchen. Dazu ist es nötig, Nachweismethoden für Plasmide in Rhizobium meliloti zu finden. Es erscheint sinnvoll, solche Methoden zuerst an bekannten Plasmiden, z.B. an Resistenzfaktoren in Rhizobium meliloti auszuarbeiten. Auf Grund seines großen Wirtsbereichs bietet sich hierfür der R-Faktor RP4 an, der in Pseudomonas

aeruginosa entdeckt (2), von dort nach Escherichia coli übertragen und genetisch charakterisiert wurde (3). Er besitzt Resistenzgene für Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin, trägt die Information zur Sensitivität der Wirtsbakterien gegenüber dem Phagen PRR1 (4) und hat eine Resistenz-Transfer-Einheit (RTF), die die Übertragung dieses Plasmids auf andere Bakterien ermöglicht. In dieser Arbeit wird der RP4-Faktor nach Rhizobium meliloti übertragen und dort genetisch und molekularbiologisch nachgewiesen. Außerdem wird untersucht, ob die Anwesenheit des RP4-Faktors einen Einfluß auf die symbiontische Stickstofffixierung von Rhizobium meliloti ausübt. Mischinfektion mit RP4-freien und RP4-tragenden Rhizobium meliloti-Stämmen geben zusätzlich Auskunft über den Infektionsvorgang und über genetische Wechselbeziehungen der Bakterienzellen untereinander in der infizierten Pflanze.

III. Material und Methoden

III.1. Bakterienstämme, Nährmedien und Puffer

III.1.1. Bakterienstämme

Bakterien- gattung	Stamm- Nr.	genet. Eigenschaften	Herkunft
<u>Rhizobium</u> <u>meliloti</u>	20-1	prt, str-s, inf ⁺ eff ⁺	J.Dénarié, Versailles (5) identisch mit 2011
<u>Rhizobium</u> <u>meliloti</u>	20-2	ade, str-r, inf ⁺ eff ⁻	J.Dénarié, Versailles (5) identisch mit Sa10B61
<u>Rhizobium</u> <u>meliloti</u>	20-26	ade, str-r, inf ⁺ eff ⁺	durch Nitrit-Mutagenese aus 20-2, Samml. Erlangen
<u>Rhizobium</u> <u>lupini</u>	1-486	ilv, car-y, str-r	A.Pühler (6), Sammlung Erlangen
<u>Escherichia</u> <u>coli</u>	K 12	str-s	Sammlung Erlangen
<u>Escherichia</u> <u>coli</u>	K 12-1	prt, str-r	Spontanmutante von K 12, Sammlung Erlangen

III.1.2. Der RP4-Faktor und der RNA-Phage PRRL

Der Resistenzfaktor RP4 wurde 1971 von Hedges (7) auf
R.lupini übertragen. Der Transfer in R.lupini und nach

E.coli verläuft ohne Schwierigkeiten (8). Im weiteren weist der Zusatz (RP⁴) zur Stammmnummer auf die Anwesenheit des Resistenzfaktors hin.

Der RP⁴-spezifische Phage PRRL wurde von Olsen (Michigan, USA) zur Verfügung gestellt.

III.1.3. Nährmedien und Puffer

NB (Nutrient Broth): Vollmedium (Difco, Detroit, USA)

YMB (Yeast Mannitol Broth): Vollmedium für Rhizobien (9)

In 1 l Medium sind enthalten:

0.5 g	K ₂ HPO ₄
0.1 g	NaCl
0.4 g	Yeast Extract (Difco)
10.0 g	Mannit
0.2 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
Wasser ad 1000 ml	

Wenn nicht anders vermerkt wird immer deionisiertes Wasser verwendet.

LBCa: Luria Broth - Vollmedium mit Ca-Zusatz

In 1 l Medium sind enthalten:

10 g	Bacto Tryptone (Difco)
5 g	Yeast Extract (Difco)
5 g	NaCl
1 g	Glukose
700 ml	Wasser

mit NaOH pH 7.2 einstellen

2.5 ml 1M CaCl_2

Wasser ad 1000 ml

MM : Minimalmedium nach (10)

Die entsprechenden Festmedien (1 l $\hat{=}$ 25 Platten) enthalten in 1 l noch 15 g Agar (Oxoid).

Antibiotika-Zusätze für Festmedien:

Kanamycin	Kan	40 $\mu\text{g/ml}$
Ampicillin	Amp	400 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclin	Tet	30 $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	Str	200 $\mu\text{g/ml}$

Nährmedium für Pflanzen nach Jensen (11)

In 1 l Medium sind enthalten:

1.0 g	CaHPO_4
0.2 g	K_2HPO_4
0.2 g	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0.2 g	NaCl
0.1 g	FeCl_3
zusätzlich	Spurenelemente (12)

Wasser (bidest.) ad 1000 ml

PBS (Phosphate-Buffer-Solution): Phagenpuffer

In 900 ml Puffer sind enthalten:

3.6 g	NaCl
2.7 g	KH_2PO_4
6.3 g	Na_2HPO_4
700 ml	Wasser
Mit HCl auf pH 6.8 einstellen	
Wasser ad 900 ml	

TES-Puffer: Bakterien- und DNA-Puffer (13)

50 mM Tris-HCl
5 mM EDTA
50 mM NaCl
pH 8

III.2. Chemikalien und Verzeichnis der Abkürzungen

III.2.1. Chemikalien

Quecksilber(II)chlorid (HgCl_2), Caesiumchlorid p.a. (CsCl),
Uranylacetat, Äthylendiamino-tetraessigsäure (EDTA), Saccharose (Sucrose),
D-(-)-Mannit, Tris-hydroxymethyl-amino-methan (Tris): Merck, Darmstadt.
Streptomycinsulfat (Str), Athidiumbromid (EtBr), Ribonuklease.pankr.
reinst (RNase), Cytochrom C : Serva, Heidelberg.
Ampicillin (Amp), Tetracyclin (Tet) : Hoechst, Frankfurt
Kanamycin (Kan): Gruenenthal, Stolberg/Rheinl.
Sarkosyl NL 30: Geigy, Basel
Lysozym: Boehringer, Mannheim .

III.2.2. Verzeichnis der Abkürzungen (genetische Abkürzungen
nach Demarec (14)).

prt	Prototrophie
ade	Auxotrophie für Adenin
ilv	Auxotrophie für Isoleucin und Valin
car	Genetische Markierung für die Produktion von Carotinoid-Farbstoff, z.B. car-y für gelb (yellow)
str	Genet. Markierung für Streptomycin-Sensitivität oder -Resistenz
Str	Streptomycinsulfat
amp	Genet. Markierung für Ampicillin-Sensitivität oder -Resistenz
Amp	Ampicillin
kan	Genet. Markierung für Kanamycin-Sensitivität oder -Resistenz
Kan	Kanamycin
tet	Genet. Markierung für Tetracyclin-Sensitivität oder -Resistenz
Tet	Tetracyclin
r	resistent
s	sensitiv
inf ⁺	Infektion von Pflanzenwurzelhaaren zur Knöllchen- bildung
eff ⁺	effektive Stickstofffixierung im Knöllchen
eff ⁻	keine Stickstofffixierung im Knöllchen
ccc-DNA	<u>c</u> o <u>v</u> alently <u>c</u> losed <u>c</u> ircular DNA kovalent geschlossene, ringförmige DNA

oc-DNA	<u>open circular</u> DNA: ringförmige DNA mit Einstrangbruch
RTF-Einheit	Resistenz-Transfer-Einheit
MHK	Minimale Hemmkonzentration
CsCl	Cäsiumchlorid
EthBr	Äthidiumbromid
HgCl ₂	Quecksilber-(II)-chlorid
rNase	Ribonuclease

III.3. Methoden zum genetischen Teil

III.3.1. Resistenztest von R.meliloti-Stämmen mit und ohne RP4-Faktor durch Stempeltest

Einzelkolonien von R.meliloti-Stämmen mit und ohne RP4-Faktor werden von Vollmediumplatten auf Platten mit je einem Antibiotikumzusatz (Amp, Kan, Tet) überstempelt und vier Tage bei 30°C inkubiert. Wachstum weist auf die Anwesenheit des RP4-Faktors hin.

III.3.2. Bakterienanzucht

Die Bakterien werden mit einer sterilen Platinöse von der Stammpalte abgenommen, in 10 ml Medium suspendiert und für zwei Tage bei 30°C im Rotator bebrütet. Die Dichte einer solchen Kultur entspricht der einer E.coli-Übernachtskultur.

III.3.3. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte einer Bakteriensuspension wurde bei 580 nm (OD_{580}) am Spectronic 20 der Firma Bausch und Lomb gemessen.

III.3.4. RP4-Transfer

a) RP4-Transfer von R.lupini(RP4) nach R.meliloti

Übernachtskulturen des gelb-pigmentierten RP4-Donorstammes und des farblosen Rezipientenstammes werden im Verhältnis 1:2 gemischt, davon 0.4 ml auf YMB-Platten ausplattiert

und 24 - 30 Std. bei 30°C inkubiert. Die Bakterien werden mit einem sterilen Metallospatel vom Festmedium abgekratzt und in 1 ml sterilen Wasser aufgenommen. Zur Selektion RP4-haltiger Rezipienten wird eine Verdünnungsreihe angelegt und aus geeigneten Verdünnungsstufen auf YMB+Tet-Platten ausplattiert. Farblose Agalliori-Kolonien, die neben den gelben RP4-Donor-Kolonien anwachsen, tragen den RP4-Faktor.

2. RP4-Transfer von einem sens-Donor nach einem sens- Rezipienten

Kultursuspensionen eines sens- RP4-Donorstammes und eines sens- Rezipientenstammes werden im Verhältnis 1:1 gemischt und davon 0.4 ml auf YMB-Platten ausplattiert. Nach 28 Std. bei 30°C werden die Bakterien mit 2 ml Streptomycinlösung (200 µg/ml) abgeschwenkt. Zur Selektion RP4-haltiger Rezipienten wird eine Verdünnungsreihe angelegt und aus geeigneten Verdünnungsstufen auf YMB+Tet+Str-Platten ausplattiert. Nur Rezipienten, auf die während der gemeinsamen Inkubation der RP4-Faktor übertragen wurde, können anwachsen. Bei Orientierung auxotropher Rezipienten neben prototrophen Donoren empfiehlt sich zusätzlich ein Auxotrophietest auf Veratridium.

III.3.5. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHC) eines Antibiotikums

eine Verdünnungsreihe eines Antibiotikums in Verdünnungen (z.B. 2, 4, 8, 16, 32 etc. μ g/ml) wird mit jeweils der gleichen Menge Bakterien suspension aus einer Übernachtskultur beimpft und bei 30°C inkubiert. Das Wachstum der einzelnen Kulturen mit unterschiedlicher Antibiotikonzentration wird über einen längeren Zeitraum mit Hilfe der optischen Dichtemessung verfolgt. Die minimale Hemmkonzentration ist die niedrigste Antibiotik Verdünnung, bei der bereits kein Wachstum nachzuweisen ist.

III.3.6. Phagentropftest mit dem Spot-Phage

Auf einem Vollmedium wird der zu untersuchende Bakterienstamm zu einem Rasen ausplattiert und in die Mitte der Platte ein Phagenlysate aufgetropft. Nach einiger Inkubation der Platte bei 30°C deutet eine Lysation die Phagensensitivität des zu untersuchenden Stammes an.

III.3.7. Phagenvermehrung

Je 1 ml einer Kultur eines phagensensitiven Bakterienstammes wird mit einem Phagenlysat vermischt (Multiplizität ca 10^{-2}), auf LBCa-Platten ausgegossen und 1 Tag bei 30°C inkubiert.

Die Platten werden mit je 2.5 ml PBS abgeschwemmt, die erhaltene Suspension zur Freisetzung reifer Phagen aus noch nicht lysierten Bakterienzellen mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und intensiv geschüttelt. Der nach Zentrifugation dieser Mischung ($10.00 \times g$, 10 min, 4°C) erhaltene wäßrige Überstand ist das neue Phagenlysat.

III.3.8. Phagentiterung eines PRR1-Lysats

Vom erhaltenen Phagenlysat wird eine Verdünnungsreihe angelegt. Aus geeigneten Verdünnungsstufen werden je 0.1 ml zusammen mit 0.05 ml einer Indikatorbakterienkultur in je 2 ml Weichagar (6 g Agar/l) pipettiert und die Mischung auf LBCa-Platten ausgegossen. Nach Inkubation bei 30°C werden die entstandenen Plaques gezählt und daraus der gesuchte Titer (pfu/ml) berechnet.

III.4. Methoden zum molekularbiologischen Teil

III.4.1. Lyse von *B. meliloti*-Zellen nach Helinski (15)

zur Gewinnung der zellulären DNA

Bakterien werden in 30 ml YMB bis zu einer OD_{580} von 0.5 - 0.7 angezogen, abzentrifugiert ($10.000 \times g$, 10 min, 5°C) und zweimal

mit je 10 ml TES-Puffer (vgl. III.1.) gewaschen. Das Sediment wird in 0.75 ml Sucrose (20% in TES) resuspendiert und mit 0.75 ml Lysozym-RNase-Lösung (Lysozym 8 mg/ml, RNase 2 mg/ml, 20% Sucrose in TES) vermischt. Das Reagenzglas mit der Mischung wird 20 Minuten bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 0.3 ml Sarkosyl-Lösung (Sarkosyl NL 30, 10% in 0.25 M EDTA) bis zum Aufklaren in der Hand gedreht.

III.4.4. Präparative Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-EthBr-Dichtegradienten zur Abtrennung der Plasmid-DNA

In einem Polyallomer-Zentrifugenröhrchen wird dem erhaltenen Sarkosyllysat 0.15 ml EtBr-Lösung (10 mg/ml in TES) zugesetzt und mit TES-Puffer auf 5 ml aufgefüllt. 4.75 g CsCl (p.A.) werden darin gelöst und die Mischung im Festwinkelrotor Ti 75 (Beckman) mindestens 45 Std. zentrifugiert (34.000 Upm, mittlere g-Zahl 80.000, 25°C). Danach können durch Bestrahlen mit langwelligem UV-Licht (360 nm) die ausgebildeten DNA-Banden (chromosomale und episomale DNA) im Zentrifugenröhrchen sichtbar gemacht werden. Zur Isolierung der Plasmid-DNA-Bande wird das Röhrchen senkrecht in einen Halter eingespannt und seitlich etwas unter der entsprechenden Bande mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle angestochen. Die sichtbare Bande kann direkt in die Spritze gesaugt werden. Da die Plasmidbande meist noch mit der chromosomalen DNA-Bande in Verbindung steht ist es ratsam, vorher auf die gleiche Weise die chromosomale DNA-Bande zu entfernen. Dadurch wird einem Vermischen mit der Plasmidbande bei ihrer Abnahme vorgebeugt.

III.4.3. Darstellung von Plasmid-DNA im Elektronenmikroskop (16)

1 μ l der Plasmid-DNA wird ohne Vorbehandlung mit 490 μ l Spreitungslösung vermischt (2.56ml A.bidest., 0.3 ml L2-Lösung (2 M Ammoniumacetat, 10^{-2} M EDTA in A.bidest.) 0.08 ml 0.01% Cytochrom C in A.bidest.), Col-EI-DNA-Lösung wird als interner Standard zugesetzt und mit einer Pipette Tropfen davon (ca. 50 μ l) auf eine Teflonbeschichtete Fläche gesetzt. Die Tropfen werden zum Schutz gegen Staub abgedeckt und mindestens 30 Minuten stehen lassen. Die durch Cytochrom C gespreitete DNA kann mit parlodionbeschichteten Kupfernetzen von der Oberfläche abgenommen werden. Dazu werden die Kupfernetze mit der Filmseite kurz auf die Tropfenoberfläche gelegt und anschließend zum "positive staining" 10 Sek. in alkoholische Uranylacetatlösung getaucht (50 mM Uranylacetat, 50 mM HCl in 90% Äthanol; 1:1000 in 90% Äthanol verdünnen und filtrieren). Nach 10 Sek. in 90% Äthanol und 30 Sek. in Isopentan werden sie in der Wärme getrocknet. Zur Verstärkung des Kontrasts schließt sich eine Rotationsbedampfung der Schichtseite der Kupfernetze mit Pt/Pd im Vakuum an (30 A, 50 Sek., 6.5° , 4.5cm Abstand, in der Bedampfanlage Jeol, JEE 4B Japan). Im Elektronenmikroskop JEM 7 A (Jeol, Japan) wird die DNA sichtbar gemacht und fotografiert.

III.4.4. DNA-Längenmessung

Zur Längenmessung der DNA werden die Negative auf Papier projiziert (Avanti-Projektor, Liesegang, Düsseldorf; Vergrößerung 16-fach), die Konturen der Moleküle nachgezeichnet und die Länge der DNA mit einem Kurvenmessgerät (für Landkarten) ermittelt. Ein Vergleich

der gefundenen Länge mit der gemessenen und bekannten Länge des internen Standards (Col-EI) ergibt die tatsächliche Länge der DNA.

III.5. Methoden zum Nachweis der symbiontischen Stickstofffixierung

III.5.1. Pflanzenanzucht (mod. nach (7)) und Bakterieninfektion

a) Sterilisieren der Samen (Medicago sativa)

Ein kleines Thunberg-Röhrchen (10ml) wird bis zu einem Viertel mit Luzernesamen gefüllt und soviel 0.1%ige Quecksilber-(II)-chlorid-Lösung (HgCl_2) zugegeben, daß die Samen eben bedeckt sind. Einige Tropfen Detergenz (Aufheben der Oberflächenspannung) werden zugesetzt und ein Wasserstrahlvakuum angelegt. Wenn sich keine Luftblasen mehr von den Samen lösen kann das HgCl_2 allseits bis zur Samenschale vordringen und gewährleistet optimale Sterilisation. Nach 10 - 15 Minuten in HgCl_2 werden die Samen in eine sterile Petrischale geschüttet und 5 - 6 mal mit sterilem Wasser gewaschen. Zur Sterilitätskontrolle werden die Samen ein bis zwei Tage auf einer NB-Platte bei 30°C vorgekeimt.

b) Vorbereitung der Kulturgefäße

Feiner Kies wird mindestens 30 Minuten in fließendem Wasser gewaschen und 1 cm hoch in 100 ml Erlenmeyerkolben gefüllt. Die Kolben werden mit kleiner Glaskappe verschlossen und bei 180°C sterilisiert. Der sterile Kies wird mit Nährmedium nach Jensen (vgl. III.1.) eben bedeckt.

c) Einpflanzen der Keime, Bakterienzusatz und Wachstumsbedingungen

In je einen Kolben wird ein angekeimter Same mit einer sterilen Pinzette so auf den Kies gesetzt, daß die Wurzeln leicht eindringen können. 0.15 ml einer möglichst dicken Bakteriensuspension (10^{10} Zellen/ml oder mehr) werden direkt auf die Wurzel getropft um eine schnelle Infektion zu gewährleisten. Bei $20 - 23^{\circ}\text{C}$ werden die Pflanzen sechs Wochen im 17-Stunden-Tag kultiviert. Gelegentlich muß steriles Wasser nachgefüllt werden.

III.5.2. Nachweis der Nitrogenaseaktivität über die Acetylenreduktion

Sechs Wochen nach dem Animpfen der Keimlinge mit Bakterien werden von den auf Effektivität zu untersuchenden Pflanzen die Wurzeln mit den Knöllchen in einem kleinen Meßgefäß mit definierter Gasatmosphäre (80% Helium, 10% Sauerstoff, 10% Acetylen) verschlossen. Durch den mit einem Septum versehenen Gummistopfen wird zu bestimmten Zeiten mit einer Spritze Gas entnommen, in einem Gaschromatographen (Hewlett-Packard 5700 A) die Menge des entstandenen Äthylens bestimmt und als Schreiberdiagramm aufgezeichnet (Trärgas Helium, Säulenlänge 150 cm, Säulenfüllung Poropak N, Ofentemperatur 60°C , Wärmeleitfähigkeitsdetektor). Die Umrechnung der Fläche unter dem Äthylengipfel im Gaschromatogramm auf nMol Äthylen erfolgte an Hand einer experimentell aufgenommenen Eichkurve (nM Äthylen/cm² Fläche). Am Ende der Messung (nach 3 Stunden) werden die Knöllchen von der Wurzel getrennt und gewogen. Zur Standardisierung der Ergebnisse wird die gemessene Äthylenmenge auf das Knöllchenfrischgewicht bezogen (nM Äthylen/mg Knöllchen).

III.6. Isolierung lebensfähiger Bakterien z.B. E. coli

Das Kollidion ist vor der Arbeit sterilt zu halten. Die Ausgangsplatte mit HgCl_2 sterilisiert (z.B. 100°C, 15 min) und auf einer YMB-Platte zur Sterilitätskontrolle abgestrichen. Das Kollidion wird mit einer sterilen Pinzette zerquetscht und auf eine YMB-Platte aufgetragen. Lebensfähige Bakterien wachsen an und mit Zahnstochern werden davon Einzelkolonien auf eine YMB-Platte gesetzt. Der H_2S -Faktor läßt sich durch Überstreichen dieser Ausgangsplatte auf H_2S -biotikummedien nachweisen.

IV. Ergebnisse

IV.1. Genetische Experimente mit dem RP4-Faktor in *R.meliloti*

Der RP4-Faktor verleiht Wirtsbakterien Resistenz gegen die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin. Bakterienwachstum in Gegenwart dieser Antibiotika gilt als ein Nachweis des RP4-Faktors in diesen Bakterien.

IV.1.1. Transfer des RP4-Faktors nach *R.meliloti*

Der RP4-Faktor wurde von *R.lupini* 1-486(RP4) und von *E.coli* K 12(RP4) nach *R.meliloti* übertragen. Beide Donoren wurden auf Grund folgender genetischer Eigenschaften ausgewählt:

- (1) *R.lupini* 1-486(RP4) bildet im Gegensatz zum Rezipienten *R.meliloti* gelb gefärbte Kolonien aus, die sich auf Selektionsplatten mit Antibiotikum (Amp, Kan, Tet) gut von den Rezipientenkolonien unterscheiden lassen.
- (2) *E.coli* K 12(RP4) kann auf Grund seiner Sensitivität gegen Streptomycin nach Kreuzung mit einem str-r Rezipienten bei Selektion auf str-haltigem Medium nicht anwachsen. Wird diesen Selektionsplatten noch Antibiotikum (Amp, Kan, Tet) zugesetzt, so wachsen nur RP4-tragende Rezipientenzellen an.

Zum RP4-Transfer wurden Donor und Rezipient gemischt (vgl. III.3.4.) und auf einer Vollmediumplatte etwa einen Tag bei 30°C inkubiert. Die anschließende Selektion nach RP4-haltigen

Rezipientenkolonien auf den entsprechenden Selektionsmedien (vgl III.3.4.) ergab in beiden Fällen RP4-tragende R.meliloti-Stämme. Tabelle 1 zeigt neben der Übertragungshäufigkeit auch die Bezeichnung der entstandenen Stämme.

RP4-Donor	<u>R.meliloti</u> (RP4-Rezipient)	entstandener Stamm	Übertragungs- häufigkeit
<u>R.lupini</u> 1-486(RP4)	2o-1	2o-1(RP4)	1.15×10^{-1}
	2o-2	2o-2(RP4)	1.44×10^{-1}
	2o-26	2o-26(RP4)	2.33×10^{-1}
<u>E.coli</u> K 12(RP4)	2o-2	2o-2(RP4 <u>E.c.</u> *)	1.68×10^{-7}

Tab.1: Übertragungshäufigkeit des RP4-Faktors von verschiedenen RP4-Donoren nach R.meliloti und Bezeichnung der entstandenen Stämme.

*) (RP4 E.c.) bedeutet, daß R.meliloti 2o-2(RP4 E.c.) durch Übertragung des RP4-Faktors aus E.coli entstand.

Während bei Übertragung des RP4-Faktors von R.lupini nach R.meliloti eine Übertragungshäufigkeit im Prozentbereich gefunden wurde, lag sie bei Übertragung von E.coli nach R.meliloti drastisch niedriger (vgl. dazu V.).

IV.1.2. Nachweis der genetischen Eigenschaften des RP4-Faktors
in *R.meliloti*

Für den RP4-Faktor wurden in *E.coli* (3) bisher folgende genetische Eigenschaften nachgewiesen:

- (1) Der RP4-Faktor besitzt eine Resistenz-Transfer-Einheit (RTF-Einheit), die eine selbständige Übertragung des RP4-Faktors auf andere Bakterien ermöglicht.
- (2) Er verleiht seiner Wirtszelle die Resistenzen gegen Ampicillin (amp-r), Kanamycin (kan-r) und Tetracyclin (tet-r).
- (3) Außerdem ist er für eine Sensitivität seiner Wirtszelle für den RNA-Phagen PRR1 verantwortlich (PRR1-s).

Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über diese Eigenschaften.

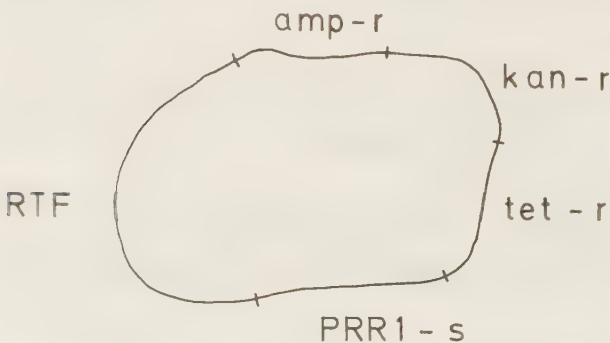


Abb.1: Schema des RP4-Faktors mit bisher bekannten genetischen Markierungen.

Die einzelnen genetischen Markierungen sind willkürlich angeordnet. Die Abkürzungen werden im Text erklärt.

a) Nachweis der RTF-Einheit des RP4-Faktors in R.meliloti

Bei Vorliegen der RTF-Einheit des RP4-Faktors in R.meliloti sollte sich der RP4-Faktor von R.meliloti 2o-1(RP4) str-s (aus IV.1.1.) auf andere Bakterienstämme übertragen lassen. Als Rezipienten boten sich an:

- (1) R.meliloti 2o-2 (str-r)
- (2) E.coli K 12-1 (str-r)
- (3) R.lupini 1-486 (Farbselektion)

Der Transfer des RP4-Faktors erfolgte in den Fällen 1 und 2 nach III.3.4.b, das Wachstum des Donors wurde bei der Selektion mit Streptomycin unterbunden. Die Übertragungshäufigkeit und die Bezeichnung der neuen Stämme sind in Tabelle 2 dargestellt.

RP4-Donor	RP4-Rezipient	entstandener Stamm	Übertragungshäufigkeit
<u>R.meliloti</u> 2o-1(RP4)	<u>R.meliloti</u> 2o-2	<u>R.meliloti</u> 2o-2(RP4 R.m.) *	3.3×10^{-1}
	<u>E.coli</u> K 12-1	<u>E.coli</u> K 12-1(RP4)	3.3×10^{-1}

Tab.2: Übertragungshäufigkeit des RP4-Faktors von R.meliloti auf verschiedene Rezipienten und Bezeichnung der entstandenen Stämme.

* (RP4 R.m.) bedeutet, daß R.meliloti 2o-2(RP4 R.m.) durch Übertragung des RP4-Faktors aus R.meliloti entstand.

Im Fall 3 konnte mit keiner der vorgestellten Übertragungstechniken (III.3.4.) ein Transfer erreicht werden. Versuche, den RP4-Faktor aus R.meliloti 2o-2(RP4) und 2o-26(RP4) nach R.lupini zu übertragen, schlugen ebenfalls fehl. Da das Vorliegen der RTF-Einheit in R.meliloti durch die Übertragung des Plasmids auf R.meliloti und E.coli (Fall 1 und 2) auf Grund der hohen Übertragungshäufigkeit genügend abgesichert ist, wurden die Versuche zu Fall 3 nicht weiter verfolgt.

b) Nachweis der Resistenzgene des RP4-Faktors in R.meliloti

Das Vorliegen der Resistenzgene des RP4-Faktors wurde durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) nachgewiesen (vgl. III.3.5.). Tabelle 3 zeigt die minimalen Hemmkonzentrationen von Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin für die verwendeten R.meliloti-Stämme vor und nach RP4-Transfer. Die vollständige Übertragung der drei Resistenzgene spiegelt sich in der wesentlich erhöhten Antibiotikamtoleranz der R.meliloti-Stämme nach RP4-Transfer wieder.

Bakterienstämme	Ampicillin	Kanamycin	Tetracyclin
Vor RP4-Transfer <u>R.meliloti</u> 2o-1, 2o-2, 2o-26	32 µg/ml	8 µg/ml	2 µg/ml
Nach RP4-Transfer <u>R.meliloti(RP4)</u> 2o-1, 2o-2, 2o-26	>128 µg/ml	32 µg/ml	64 µg/ml

Tab.3: Minimale Hemmkonzentration für Ampicillin, Kanamycin
und Tetracyclin bei R.meliloti vor und nach RP4-Transfer.

c) Test auf PRR1-Sensitivität bei R.meliloti

Das Vorliegen eines vollständigen RP4-Faktors in R.meliloti sollte sich zuletzt durch eine Sensitivität gegenüber dem Phagen PRR1 bestätigen lassen, so wie sie bei E.coli bekannt ist. Ein Phagentropftest (vgl. III.3.6.) bei allen verwendeten RP4-tragenden R.meliloti-Stämmen zeigte nicht die erwartete Lyse im Bereich des Phagenlysattropfens auf dem Bakterienrasen. Desgleichen verlief auch die Phagenvermehrung (vgl.III.3.7.) und die Titerung des entstandenen "Lysats" (vgl.III.3.8.) negativ. Die Information, die in E.coli eine PRR1-Sensitivität auslöst, ist aber auch in R.meliloti auf dem RP4-Faktor vorhanden. Der Nachweis gelang durch Transfer des RP4-Faktors von

R.meliloti nach E.coli K 12-1 (vgl.IV.1.2.a). Der entstandene Stamm E.coli K 12-1(RP4) war in der Lage, ein PRR1-Lysat um den Faktor 10^3 zu vermehren und zeigte eine positive Reaktion im Phagentropftest. Da nur vorhandene Information übertragen werden kann, muß die Sensitivität gegenüber dem Phagen PRR1 latent in R.meliloti(RP4) vorliegen. Der Nachweis auch noch dieser letzten der bisher bekannten genetischen Eigenschaften des RP4-Faktors in R.meliloti weist die Übertragung des gesamten RP4-Faktors nach R.meliloti zweifelsfrei nach.

1V.1.3. Stabilität des RP4-Faktors in R.meliloti

Nach erfolgreich verlaufenem Transfer des RP4-Faktors nach R.meliloti ist seine Verträglichkeit mit seiner Wirtszelle von Interesse. Eine hohe Verträglichkeit wäre gewährleistet durch ein stabiles Vorliegen des RP4-Faktors in R.meliloti in allen Wachstumsphasen und würde darüberhinaus dadurch unterstrichen, daß auch eine "Knöllchenpassage" keinen Spontanverlust des RP4-Faktors in R.meliloti auslöst.

a) Stabilität des RP4-Faktors in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Zum Nachweis eines stabilen Vorliegens des RP4-Faktors

in R.meliloti wurden aus Flüssigkulturen der R.meliloti-
(RP4)-Stämme zu verschiedenen Wachstumsphasen (lag-, log-,
stat- und späte stat-Phase) Proben entnommen. Einzel-
kolonien davon auf YMB-Platten wurden auf YMB-Platten
mit Antibiotikuzusatz (YMB+Amp, YMB+Kan, YMB+Tet) über-
stempelt und das Verhältnis der Zahl der resistenten
Kolonien zu der Zahl der Kolonien auf der Kontrollplatte
bestimmt. In Abbildung 2 ist dieses Verhältnis für alle
untersuchten Stämme gegen die Zeit (Wachstumsphasen) aufgetragen.
Im Gegensatz zu R.lupini (8) ist bei R.meliloti der
RP4-Faktor in allen Stämmen in jeder Wachstumsphase stabil
und kein Spontanverlust einer Antibiotikaresistenz nach-
zuweisen.

b) Einfluß einer Knöllchenpassage auf den RP4-Faktor in
R.meliloti

Die Stabilität des RP4-Faktors in R.meliloti in allen
Wachstumsphasen läßt vermuten, daß er auch eine Knöllchen-
passage stabil übersteht und dabei keine Veränderung in
seinem Antibiotikaresistenzspektrum erfährt. Zum Nachweis
wurden Luzernepflanzen mit RP4-tragenden R.meliloti-Stämmen
infiziert und aus den entstandenen Wurzelknöllchen lebens-
fähige Bakterien zurückgewonnen (vgl. III.6.). Durch Über-
stempeln von Einzelkolonien von YMB auf YMB mit Antibioti-
kumzusatz (YMB+Amp, YMB+Kan, YMB+Tet) konnte gezeigt
werden, daß der RP4-Faktor die Knöllchenpassage ohne

Veränderung oder Verlust aller oder einzelner Resistenzgene überstanden hat. Hier zeigt sich erneut die hohe Verträglichkeit des R-Faktors mit der Wirtszelle.

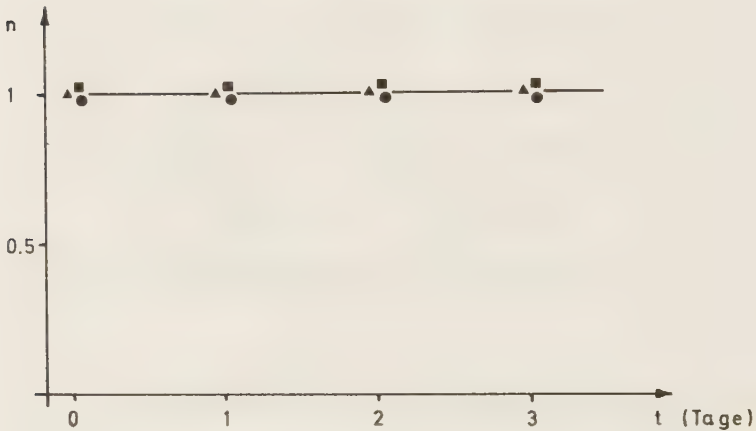


Abb.2: Stabilität des RP4-Faktors in R.meliloti

Das Verhältnis n der resistenten Kolonien zu den Kolonien auf der Kontrollplatte (für alle Stämme und Antibiotika gleich 1) ist gegen die Zeit aufgetragen. (vgl. Text)

Stämme: R.meliloti 20-1(RP4), 20-2(RP4)

20-2(RP4 R.m.), 20-26(RP4)

0 $\hat{=}$ lag-Phase, 1 $\hat{=}$ log-Phase, 2 $\hat{=}$ stat-Phase

3 $\hat{=}$ späte stat-Phase

▲ = Ampicillin, ■ = Kanamycin, ● = Tetracyclin

IV.2. Molekularbiologischer Nachweis des RP⁴-Faktors in *R.meliloti*

In IV.1. wurde der Nachweis für die Übertragung des RP⁴-Faktors auf *R.meliloti* mit Hilfe genetischer Methoden geführt. Der Nachweis auf molekularbiologischer Ebene umfaßt die Isolierung eines episomalen Elements aus *R.meliloti*(RP⁴) und Identifikation dieses Plasmids als RP⁴-Faktor.

IV.2.1. CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation

Im CsCl-Dichtegradienten werden Makromoleküle nach ihrer Aufschwimmdichte getrennt. Der nur unwesentliche Dichteunterschied verschiedener DNA-Formen (lineare = chromosomale DNA, ccc-DNA = Plasmid-DNA) des gleichen Organismus läßt sich durch Zusatz von Äthidiumbromid (EthBr) soweit vergrößern, daß die Trennung auf einem entsprechend gewählten CsCl-EthBr-Dichtegradienten möglich wird. Die chromosomale DNA kann wegen ihrer freien Enden mehr EthBr einlagern als die Plasmid-DNA, woraus sich eine größere Dichteerniedrigung ergibt. Im CsCl-EthBr-Dichtegradienten erscheint die Plasmid-DNA daher immer als die dichtere Bande unter der chromosomalen Bande.

IV.2.2. Isolierung von RP4-DNA aus R.meliloti

R.meliloti 20-26(RP4) wurde in YMB angezogen, mit Sarkosyl lysiert (vgl. III.4.1.) und das erhaltene Rohlysate einer CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Von den beiden im UV-Licht sichtbaren DNA-Banden wurde die wesentlich schwächere Plasmidbande mit einer Spritze isoliert (vgl. III.4.2.).

IV.2.3. Identifikation der isolierten Plasmid-DNA durch elektronenmikroskopische Darstellung und anschließende Längenmessung

Zur Identifikation der in IV.2.2. isolierten Plasmid-DNA wurde eine Probe zur Darstellung im Elektronenmikroskop präpariert (vgl. III.4.3.). Für eine spätere Längenmessung wurde der Präparation als interner Standard ringförmige Col E1-DNA (2.15 μ m lang (13)) zugesetzt. Die Col E1-DNA wurde von Ursula Priefer aus dem Stamm CR 34(Col E1) nach einer Methode von F.C.Cannon (17) isoliert und für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Präparate wurden im Elektronenmikroskop dargestellt, 20 Plasmid-DNA-Moleküle und 39 Col E1-DNA-Moleküle fotografiert (vgl. Abb.3) und ihre Länge vermessen (vgl. III.4.4.). In einer analogen Versuchreihe wurde RP4-DNA aus R.meliloti-Zellen nach Knöllchenpassage (vgl. III.6.) isoliert und im Elektronenmikroskop dargestellt. 6 DNA-Moleküle und 14 Col E1-DNA-Moleküle wurden fotografiert und ihre Länge bestimmt. Ein Vergleich der gemessenen Länge

der isolierten Plasmid-DNA mit der für E.coli ($19.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$) und R.lupini ($18.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$) bekannten RP4 Länge (18) weist das Plasmid als RP4-Faktor aus. Das Ergebnis der beiden Längenmessungen zeigt Tabelle 4.

Plasmid und Herkunft	vermessene Moleküle	gemessene Länge (Mittelwert)	tatsächliche bzw. berech- nete Länge
RP4 aus <u>R.meliloti</u> 20-26(RP4)	20	3230.2 mm	$19.41 \pm 0.62 \mu\text{m}$
Col E1 aus <u>CR 34</u> (Col E1)	39	357.8 mm	$2.15 \mu\text{m}$ (13)
RP4 aus 20-26(RP4) nach Knöll- chenpassage	6	3396.7 mm	$19.65 \pm 0.15 \mu\text{m}$
Col E1 aus <u>CR 34</u> (Col E1)	14	371.6 mm	$2.15 \mu\text{m}$ (13)

Tab.4: Länge von RP4-DNA verschiedener Herkunft und Längen-
angaben für den internen Standard

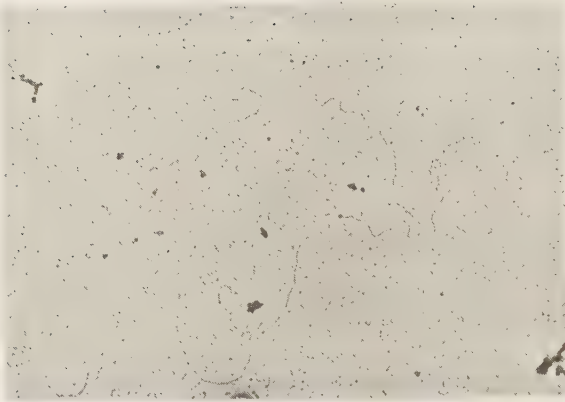


Abb.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Plasmid-DNA
(Vergrößerung 17.750 fach)

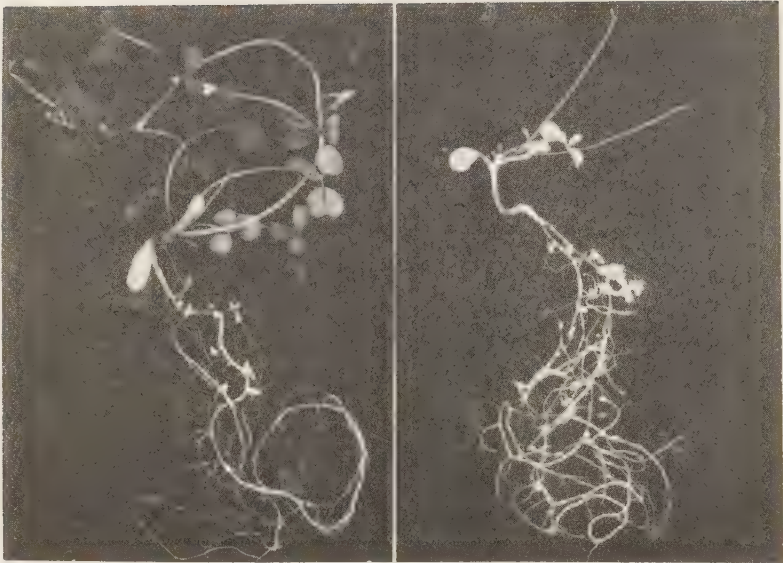
Rechts neben dem großen RP4-DNA-Molekül (Länge 19.4 μm) liegt ein Col E1-Molekül in oc-Form. Zwischen vielen DNA-Bruchstücken sind außerdem deutlich Col E1-DNA-Moleküle in ccc-Form zu erkennen.

IV.3. Einfluß des RP4-Faktors auf Infektivität und Effektivität von R.meliloti

Nachdem im Teil IV.1. auf genetischem und im Teil IV.2. auf molekularbiologischem Weg für R.meliloti die Übertragung und stabile Etablierung des vollständigen RP4-Faktors nachgewiesen wurde, wird in diesem Teil der Einfluß des RP4-Faktors auf die Infektivität und Effektivität von R.meliloti bei Luzerne (*Medicago sativa*) untersucht.

Die Fähigkeit von Bakterien symbiontisch Stickstoff zu fixieren, wird genetisch mit $\text{inf}^+ \text{eff}^+$ bezeichnet. Inf^+ steht für die Eigenschaft wurzelhaare zu infizieren und Knöllchen zu induzieren, eff^+ für die Effektivität der Stickstofffixierung. Demzufolge kann ein Stamm, der nicht Stickstoff bindet, also eff^- (ineffektiv) ist, durchaus noch in der Lage sein, Knöllchen hervorzurufen (inf^+). $\text{Inf}^+ \text{eff}^+$ -Knöllchen sind deutlich durch Leghämoglobin rosa gefärbt. Das Leghämoglobin dient im Symbiosesystem als Regulator für die Sauerstoff-Diffusion zum Nitrogenasesystem (19). $\text{Inf}^+ \text{eff}^-$ -Knöllchen enthalten kein Leghämoglobin und sind deshalb weiß.

Dadurch ist bereits eine erste qualitative Unterscheidung zwischen effektiven und ineffektiven Bakterienstämmen möglich. Ein weiteres auffälliges Unterscheidungsmerkmal ist das Pflanzenwachstum. Pflanzen, beimpft mit effektiven Bakterien, zeigen ein gutes Wachstum in stickstofffreiem Medium, Pflanzen mit ineffektiven Bakterien wachsen dagegen



(a)

(b)

Abb.4: Entwicklung von Luzernepflanzen unter dem Einfluß
von effektiven und ineffektiven R.meliloti-Bakterien

- a) Die mit effektiven Bakterien beimpfte Pflanze zeigt
gutes Wachstum und bildet gut erkennbare, rosa gefärbte
Wurzelknöllchen aus.
- b) Die mit ineffektiven Bakterien beimpfte Pflanze ent-
wickelt gut sichtbare, aber weiße Knöllchen. Das
schlechte Wachstum läßt den Mangel an verwertbaren
Ammoniumverbindungen auf Grund fehlender Stickstoff-
fixierung in diesen Wurzelknöllchen erkennen.

schlecht und sterben nach einiger Zeit infolge Stickstoffmangels ab (vgl. Abb. 4).

Neben diesen qualitativen Unterscheidungsmöglichkeiten kann die Stickstofffixierung quantitativ auch über die Acetylenreduktion bestimmt werden. Dabei wird das mit dem Stickstoff isoelektronische Acetylen dem stickstofffixierenden System (Nitrogenase) als Substrat in stickstofffreier Atmosphäre angeboten. Die Nitrogenase reduziert Acetylen zu Äthylen, das gaschromatographisch noch bis zu 1 nMol erfaßt werden kann.

Zur Untersuchung des Einflusses des RP₄-Faktors auf die symbiontische Stickstofffixierung werden folgende Experimente durchgeführt: Die Bakterienstämme R.meliloti 2o-1, 2o-2, 2o-26 und alle im Laufe dieser Arbeit entstandenen RP₄-tragenden Stämme R.meliloti 2o-1 (RP₄), 2o-2 (RP₄), 2o-2 (RP₄ R.m.), 2o-2 (RP₄ E.c.) und 2o-26 (RP₄) wurden auf Infektivität und Effektivität getestet. Pro Stamm wurden dazu bis zu 40 Luzernepflanzen angezogen und mit dem entsprechenden Bakterienstamm beimpft. Nach sechs Wochen wurden die Knöllchen der Pflanzen gaschromatographisch auf Acetylenreduktion und damit auf Stickstofffixierung untersucht (vgl. III.5.2.). An Hand der Knöllchenbildung wurde für alle untersuchten Stämme die genetische Markierung inf⁺ gefunden. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Bakterienstamm	infektiv	effektiv
20-1	+	+
20-1 (RP4)	+	+
20-26	+	+
20-26 (RP4)	+	+
20-2	+	-
20-2 (RP4)	+	+
20-2 (RP4 R.m.)	+	+
20-2 (RP4 E.c.)	+	+

Tab.5: Effektivität und Infektivität bei R.meliloti

Die Stämme 20-1 und 20-26 sind mit und ohne RP4 in der Lage, annähernd die gleiche Menge Acetylen zu reduzieren (vgl. Abb. 5). Der RP4-Faktor beeinträchtigt die Stickstofffixierung also nicht.

Bei R.meliloti 20-2 konnte der RP4-Faktor dagegen die Fähigkeit zur Stickstofffixierung wieder herstellen. Während der Stamm 20-2 ohne RP4-Faktor weiße ineffektive Knöllchen induzierte, die keine Acetylenreduktion zeigten, riefen alle RP4-tragenden 20-2-Stämme (vgl. Tab.5) rosa gefärbte, effektive Knöllchen hervor, deren Acetylenreduktion sich in der Größenordnung der Stämme 20-1 und 20-26 bewegte (vgl. Abb.6, Abb.7).

nM Äthylen/mg Knöllchen

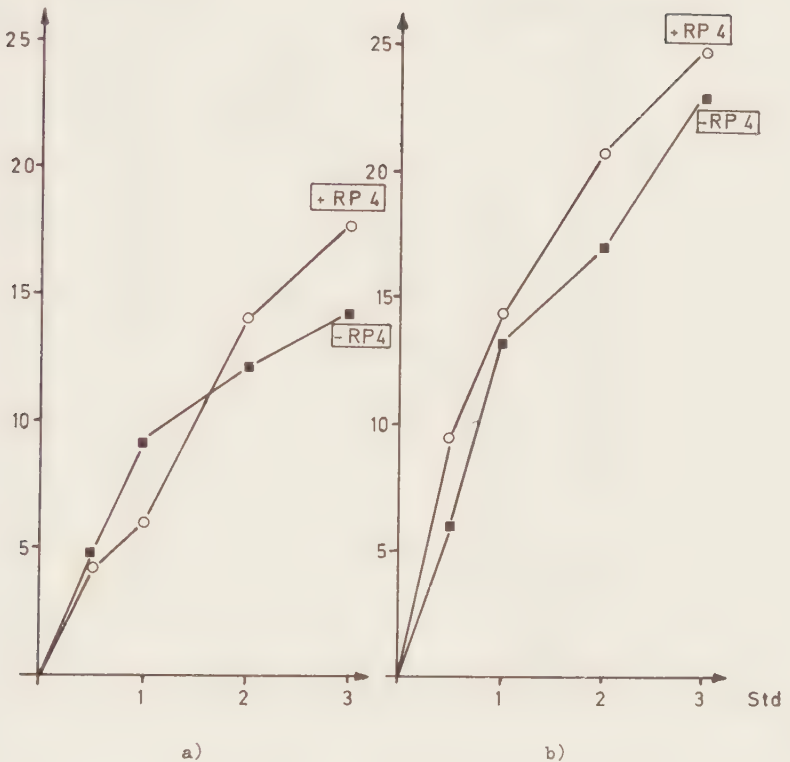


Abb.5: Einfluß des RP₄-Faktors auf die symbiontische Stickstofffixierung von R. meliloti (inf⁺ eff⁺).

Eine größere Anzahl von Luzernepflanzen wurde im Fall a) mit R. meliloti 2o-1 und 2o-1(RP₄) und im Fall b) mit R. meliloti 2o-26 und 2o-26(RP₄) infiziert. Nach Ausbildung der Wurzelknöllchen wurden je 15 Pflanzen gaschromatographisch auf Acetylenreduktion und damit auf Stickstofffixierung untersucht. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der Äthylenproduktion in Abhängigkeit von der Zeit.

nM Äthylen/mg Knöllchen

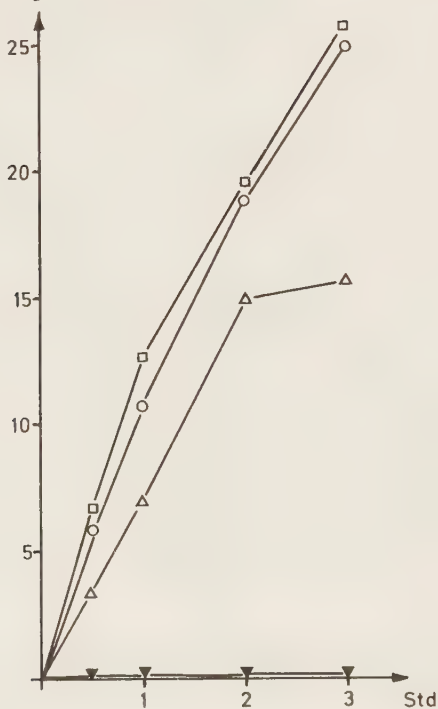


Abb.6: Einfluß des RP⁴-Faktors auf die symbiontische Stickstofffixierung von R. meliloti 2o-2.

Der Versuch wurde wie in Abb.5 beschrieben mit den Stämmen R. meliloti 2o-2 (▼), 2o-2(RP⁴ E.c.) (Δ), 2o-2(RP⁴ R.m.) (○), und 2o-2(RP⁴) (□) durchgeführt. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der Äthylenproduktion in Abhängigkeit von der Zeit

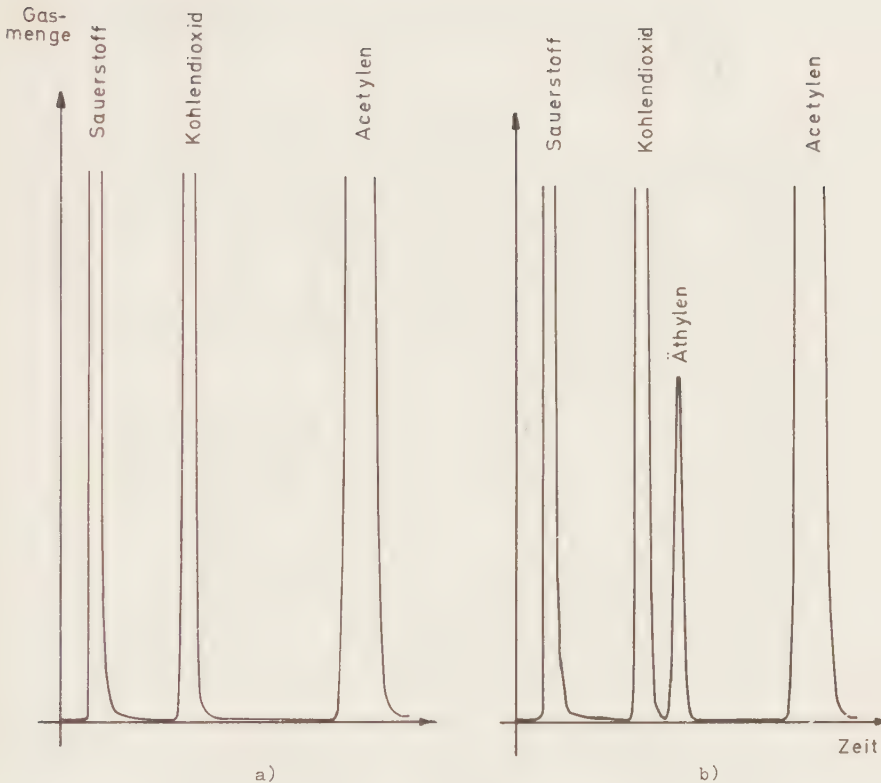


Abb.7: Gaschromatogramm bei einer Acetylenreduktion.

Die Messung entspricht den Meßwerten für eine Stunde aus der Abb.6. Gemessen wurden Knöllchen, die im Fall a) durch R.meliloti 2o-2, im Fall b) durch R.meliloti 2o-2(RP4) induziert waren. Während im Fall a) keine Acetylenreduktion nachzuweisen ist, erhöht sich der in Fall b) auftretende Äthylengipfel noch bei den folgenden Messungen (2 Std., 3 Std.). Das Kohlendioxid entsteht bei der Respiration der Knöllchen (zur Durchführung des Versuchs vgl. III.5.2.).

IV.4. Mischinfektionsexperiment mit zwei verschieden markier-
ten R.meliloti-Stämmen

Werden einer Pflanze gleichzeitig zwei verschieden markierte R.meliloti-Stämme zur Infektion angeboten, die, jeder für sich zu einer Pflanze gegeben, diese infizieren können (inf^+), so stellen sich folgende Fragen:

- (1) Dominiert ein Stamm bei der Infektion der Pflanze?
- (2) Gibt es Wurzelknöllchen, die beide R.meliloti-Stämme gleichzeitig beinhalten?
- (3) Falls sich zwei verschieden markierte R.meliloti-Stämme gleichzeitig in einem Knöllchen befinden, ist zwischen diesen dann ein chromosomaler oder extrachromosomaler DNA-Transfer nachzuweisen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Luzernekeimlinge gleichzeitig mit zwei R.meliloti-Stämmen beimpft, die sich in ihren genetischen Eigenschaften unterschieden und deshalb nach Rückgewinnung aus Knöllchen einzeln nachweisbar sein sollten. Dabei kann der erfolgreich nach R.meliloti transferierte RP4-Faktor als genetische Markierung eingesetzt werden. Im Experiment wurden die folgenden Stämme verwendet:

- (1) R.meliloti 20-1 : inf^+ eff^+ str-s
- (2) R.meliloti 20-26(RP4): inf^+ eff^+ str-r RP4

Ein chromosomaler Transfer sollte nachweisbar sein durch die Übertragung der chromosomalen Str-Markierung auf den str-s Stamm, wobei R.meliloti 20-1 str-r auftreten sollte. Ein extrachromosomaler Transfer würde durch die Übertragung des RP4-Faktors auf den RP4-freien Stamm, also durch Auftreten von

R.meliloti 2o-1 (RP4) bestätigt.

Nach sechswöchiger Kultur der Luzerne wurden aus 31 Knöllchen lebensfähige Bakterien isoliert (vgl. III.6.) und Einzelkolonien von YMB-Platten auf YMB-Platten mit Antibiotikumzusatz überstempelt (YMB + Str, YMB + Amp, YMB + Kan, YMB + Tet, YMB + Amp + Str, YMB + Kan + Str, YMB + Tet + Str). Dabei konnten in 3 Knöllchen mehrere Bakterienstämme gleichzeitig nachgewiesen werden. Von 1550 untersuchten Einzelkolonien aus den 31 Knöllchen waren:

95,6% R.meliloti 2o-1 str-s

4,0% R.meliloti 2o-26 str-r, RP4

0,4% R.meliloti 2o-1 str-s, RP4

Gleichzeitig wurde in keinem Knöllchen der Stamm 2o-26 (RP4) alleine gefunden. Er tritt immer mit 2o-1 und mit 2o-1 (RP4) zusammen auf. Damit ist nachgewiesen, daß der RP4-freie Stamm 2o-1 bei der Infektion der Luzerne eindeutig dominiert. Drei Knöllchen beinhalten beide R.meliloti-Stämme gleichzeitig und die Vermutung liegt nahe, daß mehr als ein Bakterium an der Infektion eines Wurzelhaares beteiligt sein kann. In diesen drei Wurzelknöllchen mit beiden Elternstämmen war in geringem Umfang ein extrachromosomaler (RP4-Transfer), nicht aber ein chromosomaler Transfer nachzuweisen. Mischinfektion eines Wurzelhaares und Plasmid-Transfer in Wurzelknöllchen konnte inzwischen auch von Johnston et al. (20) bei R.leguminosarum nachgewiesen werden.

V. Diskussion

V.I. Genetische Untersuchungen am RP4-Faktor in R.meliloti

Der RP4-Faktor wurde 1969 in P.aeruginosa entdeckt (2), 1971 nach E.coli übertragen und in diesem gut bekannten System charakterisiert (3). Nach Transfer des RP4-Faktors auf R.lupini (7) wurde er dort sowohl genetisch (8) als auch molekularbiologisch (18, 21, 22) untersucht.

In dieser Arbeit wurde der RP4-Faktor von R.lupini und E.coli auf R.meliloti übertragen. Beim Transfer aus R.lupini war dies mit einer hohen Übertragungsfrequenz möglich.

Dagegen zeigte die Übertragung aus E.coli nur unbefriedigende Resultate (vgl. Tab.1). Die Übertragungshäufigkeit lag dabei um den Faktor 10^6 niedriger. Von R.meliloti konnte

RP4 - Donor	RP4 - Rezipient	Übertragungshäufigkeit
<u>R.lupini</u> (RP4)	<u>R.meliloti</u>	1.44×10^{-1}
<u>R.meliloti</u> (RP4)	<u>R.lupini</u>	0
<u>E.coli</u> (RP4)	<u>R.meliloti</u>	1.68×10^{-7}
<u>R.meliloti</u> (RP4)	<u>E.coli</u>	3.3×10^{-1}
<u>R.meliloti</u> (RP4)	<u>R.meliloti</u>	3.3×10^{-1}

Tab. 6: Übertragungshäufigkeit des RP4-Faktors von unterschiedlichen RP4-Donoren auf verschiedene Rezipienten. (Zusammenfassung der Tab.1 und 2).

der RP4-Faktor mit einer sehr guten Übertragungshäufigkeit nach E.coli zurücktransferiert werden. Eine Rückübertragung nach R.lupini war nicht möglich. In Tabelle 6 sind die unterschiedlichen Transferhäufigkeiten zusammengefaßt. Dabei überrascht die sehr hohe Übertragungsfrequenz des RP4-Faktors (bis zu 33%) von R.lupini nach R.meliloti und von R.meliloti nach R.meliloti und nach E.coli. Die Transferfrequenzen, die Datta (3) nachweisen konnte, lagen für die Übertragung des RP4-Faktors von E.coli nach E.coli bei 10^{-4}

nach P.aeruginosa bei 10^{-3}

nach Chromobakterium violaceum bei 10^{-6}

nach R.trifolii bei 10^{-6}

nach R.meliloti bei 10^{-6}

nach Agrobakterium tumefaciens bei 10^{-8} - 10^{-9} .

Diese Aufzählung zeigt gleichzeitig den sehr großen Wirtsbereich des RP4-Faktors. Er kann auf viele verschiedene gram-negative Bakterien übertragen werden, wie z.B. auf Enterobakterien und Bodenbakterien. Der weite Wirtsbereich des RP4-Faktors könnte als Hinweis auf eine fehlende Restriktion dieses Plasmids in vielen Bakterienarten verstanden werden. Die Unterschiede in den Transferhäufigkeiten (vgl. Tab.6) können demnach auch nicht als eine Folge von Restriktion gedeutet werden. Die möglichen Gründe lassen sich mit derzeitigen Erkenntnissen nicht klären.

Das Vorliegen der RP4-eigenen RTF-Einheit in R.meliloti (RP4) konnte gezeigt werden durch RP4-Transfer aus R.meliloti (RP4) sowohl nach R.meliloti als auch nach E.coli (vgl. Tab.2).

Der Erwerb der bekannten Resistenzen des RP4-Faktors gegen die drei Antibiotika (Amp, Kan, Tet) durch R.meliloti konnte an Hand einer MHK-Bestimmung nachgewiesen werden (vgl. Tab.3). So tolerieren R.meliloti-Stämme mit RP4-Faktor wenigstens die vierfache Antibiotikumkonzentration als die gleichen Stämme ohne RP4-Faktor.

Die RP4-codierte Information für die Sensitivität gegen den bei E.coli gefundenen RP4-spezifischen Phagen PRR1 (4) ist in R.meliloti ebenfalls vorhanden und kann von dort durch einen RP4-Transfer auf E.coli übertragen werden. Dort ist sie mit dem Phagen PRR1 eindeutig nachzuweisen (IV.1.2.c). Dagegen wird diese Sensitivität in R.meliloti nicht ausgedrückt, wofür verschiedene Ursachen denkbar sind. Der bei E.coli als PRR1-Adsorptionsstelle gefundene RP4-codierte Pilus (23) wurde bisher bei R.meliloti noch nicht nachgewiesen und ein Fehlen ist somit nicht auszuschließen. Damit würde diesem Phagen der Angriffspunkt fehlen, womit ein Ausbleiben der Phagensensitivität zu erklären ist. Bei Vorliegen einer entsprechenden Adsorptionsstelle ist das Versagen der Phagenreaktion einmal unter der Annahme zu verstehen, daß dieser Punkt an der Bakterienoberfläche für den Phagen nicht erreichbar ist. Die stark ausgeprägte

Polysaccharidkapsel aller R.meliloti-Stämme sollte in der Lage sein, solche vielleicht recht kurze Pili gegen Phagen abzuschirmen. Wenn andererseits der Phagen eine Adsorptionsstelle findet und sein genetisches Material in die Zelle eindringen kann, so ist eine intakte RNA-Replikation des Phagengenoms Voraussetzung für die Lyse der befallenen Bakterienzelle. Sind dafür aber Wirtsfunktionen nötig, die bei E.coli vorhanden sind, bei R.meliloti jedoch fehlen, so bleibt die Lyse aus. Da zudem nach RP4-Transfer von R.meliloti nach E.coli diese Phagensensitivität - die auch in P.aeruginosa nachweisbar ist (4) - wieder auftritt, liegt die Vermutung nahe, daß der Phage PRRL eine ausgeprägte Spezifität für RP4-tragende E.coli- und P.aeruginosa-Zellen besitzt. Diese Erklärung wird gestützt durch das Ausbleiben der Phagenreaktion bei R.lupini(RP4) (24). Welcher der angeführten Gründe aber letztlich für das Ausbleiben der Phagensensitivität verantwortlich ist, kann nur durch detaillierte Untersuchungen geklärt werden.

Der RP4-Faktor etabliert sich äußerst stabil in R.meliloti (vgl. Abb.2). Im Gegensatz zu R.lupini (3) ist hier kein Spontanverlust des gesamten RP4-Faktors oder einzelner Antibiotikaresistenzgene festzustellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit analogen Untersuchungen an R.leguminosarum (25). Auch eine Knöllchenpassage übersteht der R-Faktor in R.meliloti ohne Spontanverlust aller oder einzelner Antibiotikaresistenzgene. Darüberhinaus konnte der RP4-Faktor nach einer Knöll-

chenpassage auf molekularbiologischem Wege isoliert (vgl. IV.2.2.) und im Elektronenmikroskop dargestellt werden (vgl. IV.2.3.). Die gemessene RP4-DNA-Länge ($19.65 \pm 0.15 \mu\text{m}$) stimmt überein mit der in IV.2.3. gemessenen Länge des RP4-Faktors aus R.meliloti ohne Knöllchenpassage (vgl. Tab.4).

V.2. Molekularbiologische Untersuchungen am RP4-Faktor in R.meliloti

Der RP4-Faktor wurde aus R.meliloti durch die für E.coli bekannte Lyse mit Sarkosyl (15) isoliert. Dabei scheint die ausgeprägte Polysaccharidkapsel der R.meliloti-Zellen die Lyse geringfügig zu behindern, denn im Gegensatz zu E.coli klärt hier die lysierte Zellsuspension nicht vollständig auf. Die Wirksamkeit dieser Technik wird dadurch aber nicht beeinflusst. Der isolierte R-Faktor wurde im Elektronenmikroskop dargestellt und seine Länge vermessen. Der Meßwert ($19.4 \pm 0.62 \mu\text{m}$) stimmt gut mit der bei E.coli (RP4) ($19.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$) und bei R.lupini (RP4) ($18.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$) gefundenen Länge überein (18).

V.3. Einfluß des RP4-Faktors auf die Effektivität von R.meliloti

Der RP4-Faktor in R.meliloti übt zumindest beim Stamm 20-2 einen Einfluß auf die symbiontische Stickstofffixierung aus. Nachgewiesen werden konnte dieser Einfluß durch die gaschromatographische Bestimmung der Acetylenreduktion (IV.3.1.) an Wurzelknöllchen, die einerseits durch den RP4-freien, anderer-

seits durch den RP4-tragenden R.meliloti-Stamm induziert waren. Wurzelknöllchen des RP4-freien Stammes waren nicht in der Lage, Acetylen zu Athylen zu reduzieren (vgl. Abb.6, Abb.7 a), Knöllchen des RP4-Stammes reduzierten Acetylen in normalen Raten (vgl. Abb.6, Abb.7 b). Die Information für die nach RP4-Transfer erworbene Fähigkeit zur symbiontischen Stickstofffixierung kann einerseits zusammen mit dem RP4-Faktor übertragen worden sein, andererseits aber auch latent im Rezipienten vorliegen. Eine Übertragung zusammen mit dem RP4-Faktor ist aber nur bei Transfer aus einem effektiven Donor denkbar. Da auch der absolut ineffektive Stamm E.coli(RP4) als RP4-Donor eingesetzt wurde und auch daraus ein Wandel zur Effektivität im Rezipienten resultierte, ist die gleichzeitige Übertragung auszuschließen. Die Information für die symbiontische Stickstofffixierung muß also schon im Rezipienten vorgelegen haben. Sie umfaßt sicherlich eine große Anzahl von Genen und bereits eine Störung in einem dieser Gene könnte die Stickstofffixierung unterbinden. Für die daraus resultierende Ineffektivität sind mehrere Gründe denkbar. Zum ersten könnte die Ineffektivität durch eine Störung im Nitrogenasesystem verursacht sein. Dabei sind sowohl Regulationsfehler als auch Defekte in Strukturgenen möglich. Zum zweiten würde bei einer Störung der Regulation des Sauerstoffdiffusionssystems kein Stickstoff fixiert. Zum dritten könnte ein Ausbleiben des symbiontischen Gleichgewichts zwischen Bakterien und Pflanze auf Grund eines Regulationsdefekts für das Fehlen der Stickstofffixierung verantwortlich gemacht werden. Nachdem das

Aufheben eines Defekts in einem Strukturgen durch den RP4-Faktor nur schwer vorstellbar ist, liegt die Vermutung nahe, daß der RP4-Faktor im Stamm 2o-2 einen Regulationsfehler ausgleichen könnte. Ob dieser Einfluß des RP4-Faktors auch bei anderen ineffektiven R.meliloti-Stämmen wirksam wird, konnte Ermangelung von weiteren $\text{inf}^+ \text{eff}^-$ R.meliloti-Mutanten nicht nachgeprüft werden. Alle darüber hinaus untersuchten Stämme konnten entweder bereits Stickstoff fixieren oder waren erst gar nicht in der Lage, Pflanzen zu infizieren. Eine mögliche Verstärkung der Stickstoffixierung durch den RP4-Faktor wurde nicht gefunden.

V.4. Mischinfektionsexperiment

Durch ein Mischinfektionsexperiment (vgl. IV.3.3.) konnte schließlich gezeigt werden, daß generell der RP4-freie Stamm bei der Infektion der Pflanze dominiert. Knöllchen mit beiden Bakterienstämmen wurden nur in 10% der Fälle gefunden. Dabei konnte der nicht dominierende RP4-Stamm nie allein in Knöllchen nachgewiesen werden. In "gemischten Knöllchen" war immer ein geringer RP4-Transfer nachzuweisen. Ein Spontanverlust der chromosomalen *str*-Markierung, der einen RP4-Transfer vortäuschen könnte, wurde bisher in R.meliloti nicht beobachtet und kann deshalb ausgeschlossen werden. Der durch RP4-Übertragung entstandene Stamm trat immer nur in Knöllchen mit beiden Elternstämmen auf. Daraus kann geschlossen werden, daß der Transfer erst im Knöllchen abläuft. Ein

Transfer chromosomaler Markierungen in Knöllchen wurde nicht beobachtet und wurde bisher auch außerhalb von Knöllchen nicht nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit analogen Untersuchungen von Johnston (20) an R. leguminosarum.

Herrn Prof. Dr. W. Heumann danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung während der Arbeit.

Herrn Dr. A. Pühler danke ich für sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die Einführung in wesentliche Arbeitsmethoden, für wertvolle Diskussionsbeiträge und für viele nützliche Anregungen bei der Durchführung der einzelnen Experimente.

VI. Literaturverzeichnis

- (1) Dunican, L.K.: The Genetic Control of Symbiotic Properties in Rhizobium. Abstract Book of the First International Symposium: Genetics of Industrial Microorganisms. Prag, 23. - 28. August 1970
- (2) Lowburry, E.J.L., A. Kidson, H.A.Lilly, G.A.Ayliffe und R.J.Jones: Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to Antibiotics: Emergence of Strains Highly Resistant to Carbenicillin. Lancet ii 446-452 (1969)
- (3) Datts, Naomi, R.W.Hedges, E.J.Shaw, R.B.Sykes und I.H.Richmond: Properties of an R-Factor from Pseudomonas aeruginosa. J.Bact. 108, 1244-1249 (1971)
- (4) Olsen, R.H. und Patricia Shipley: Host Range and Properties of the Pseudomonas aeruginosa R-Factor R 1822. J.Bact. 113, 772-780 (1973)
- (5) Scherrer, Agnès und J.Dénarié. Symbiotic Properties of Some Auxotrophic Mutants of Rhizobium meliloti and of Their Prototrophic Revertants. Plant and Soil, Special Volume 1971, 39-45
- (6) Pühler, A.: Dissertation, Universität Erlangen 1971
- (7) Hedges, R.W.: Persönliche Mitteilung
- (8) Pühler, A.: Habilitationsschrift, Universität Erlangen 1975
- (9) Vincent, J.M.: A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Hand Book Nr. 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1970

- (10) Heumann, W.: Conjugation in Starforming Rhizobium lupini.
Molec.Gen.Genet. 102, 132-144 (1968)
- (11) Jensen, H.L.: Nitrogen Fixation in Leguminous Plants.
I. General Characteristics of Root Nodule Bacteria Isolated
From Species of Medicago and Trifolium in Australia.
Proc.Linn.Soc.N.S.W. 66, 98-108 (1942)
- (12) Gibson, A.H.: Physical Environment and Symbiotic Nitro-
gen Fixation. I. The Effect of Root Temperature on Recently
Nodulated Trifolium subterraneum L.Plants.
J.Biol.Sci. 16, 28-42 (1965)
- (13) Bazara, M. und D.R.Helinski: Characterization of Multiple
Circular DNA-Forms of Colicinogenic Factor E1 from
Proteus mirabilis. Biochem. 7, 3513-3519 (1968)
- (14) Demerec, M., E.A.Adelberg, A.J.Clark und P.E.Hartmann:
A Proposal for a Uniform Nomenclature in Bacterial
Genetics. Genetics 54, 61-76 (1966)
- (15) Bazara, M. und D.R.Helinski: Circular DNA-Forms of
Colicinogenic Factors E1, E2 and E3 from Escherichia coli.
J.Mol.Biol. 36, 185-194 (1968)
- (16) Davis, R.W., M.Simon und U.Davidson: Electron Microscope
Heteroduplex Methods for Mapping Regions of Base Sequence
Homology in Nucleic Acids. In: Methods in Enzymology Vol.
XXI, (ed. L.Grossman und K.Moldave), Academic Press,
New York - London, S 413-428, 1971
- (17) Cannon, F.C., R.A.Dixon, J.R.Postgate und S.B.Primrose:
Chromosomal Integration of Klebsiella Nitrogen Fixation
Genes in Escherichia coli. J.Gen.Microbiol. 80, 227-239 (1974)

- (18) Burkardt, H.J.: Dissertation, Universität Erlangen 1974
- (19) Appleby, C.A.: The Role of Leghemoglobin in Symbiotic Nitrogen-Fixation. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Fixation 1974, Pullmann, Washington
- (20) Johnston, A.W.B. und J.E.Beringer: Identification of the Rhizobium Strains in Pea Root Nodules Using Genetic Markers. J.Gen.Microbiol. 87, 343-350 (1975)
- (21) Mattes, R.: Dissertation, Universität Erlangen 1974
- (22) Tucher, R.: Dissertation, Universität Erlangen 1974
- (23) Bradley, D.E.: Adsorption of Bacteriophages Specific for Pseudomonas aeruginosa R-Factors RP1 and R 1822. BBRC 57, 893-900 (1974)
- (24) Pühler, A.: Unveröffentlichte Ergebnisse
- (25) Beringer, J.E.: R-Factor Transfer in Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol. 84, 188-198 (1974)

Lebenslauf

Name: Marianne Spitzbarth, geb. Wunder

Geburtstag: 8. 8. 1948

Geburtsort: Kulmbach

Eltern: Heinrich Wunder, Kaufmann und
Luise Wunder, geb. Morgner

Schulen: September 1954 - Juli 1958 Volksschule
in Kulmbach.
September 1958 - Juli 1967 Neusprachliches
Gymnasium für Mädchen in Kulmbach.
21. Juli 1967 Reifezeugnis des Neusprach-
lichen Gymnasiums für Mädchen in
Kulmbach.

Studium: November 1967 - Februar 1973 Studium der
Biologie an der Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen - Nürnberg.
4. Mai 1970 Diplom-Biologen-Vorprüfung.
27. Februar 1973 Diplom-Biologen-
Hauptprüfung.
Thema der Diplomarbeit: Streptomycin-
einwirkung auf den chromosomalen Transfer
bei *Rhizobium lupini*.
Seit Mai 1973 Anfertigung der Dissertation
am Institut für Mikrobiologie der Univer-
sität Erlangen - Nürnberg.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990